

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Eremina Anna

STANOVENÍ ANABOLICKÝCH ANDROGENNÍCH
STEROIDŮ VE FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH
ZÍSKANÝCH NA ČERNÉM TRHU

Determination of anabolic androgenic steroids in
pharmaceutical products obtained on the black market

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. dubna 2019.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce byl vývoj a validace analytické metody používající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s detekcí diodového pole ke stanovení vybraných anabolických steroidů, stanozololu a methandienonu, v tabletové formě a ověření, že dražší stanozolol není nahrazován levnějším methandienonem. K analýze byly použité tablety Strombafort a Alphabol.

Optimální podmínky pro HPLC-DAD separaci dvou anabolických steroidů byly kolona Poroshell HPH - 18 (3,0 x 100 mm, velikost částic 2,7 μm), naplněna povrchově porézními částicemi, mobilní fáze složena z 40/60 (v/v) acetonitrilu a deionizované vody za isokratické eluce. Teplota kolony byla 30 °C, objem nástriku – 1 μl a průtok mobilní fáze 0,5 ml/min. Stanovení bylo prováděno za dvou vlnových délek 225 nm pro stanozolol a 245 nm pro methandienon. Celková doba analýzy trvala 6 minut.

Byly stanoveny hodnoty koncentrace stanozololu a methandienonu v analyzovaných farmaceutických přípravcích Alphabol a Strombafort. Farmaceutický přípravek Alphabol obsahoval $100,31 \pm 0,18$ % deklarovaného množství methandienonu a farmaceutický přípravek Strombafort obsahoval $92,76 \pm 0,29$ % deklarovaného množství stanozololu. Na základě uvedených hodnot bylo určeno, že farmaceutický přípravek Alphabol obsahoval pouze methandienon o stejném množství, jak bylo deklarováno v příbalovém letáku. Farmaceutický přípravek Strombafort obsahoval stanozolol, ale v menším množství, než bylo uvedeno v příbalovém letáku, a také malé množství další neznámé látky.

Klíčová slova

Anabolické steroidy, stanozolol, methandienon, HPLC-DAD

Abstract

The aim of this bachelor thesis was development and validation of an analytical method using high performance liquid chromatography to determine selected anabolic steroids, stanozolol and methandienone, in tablet form, and to verify that more expensive stanozolol is not replaced by cheaper methandienone. Strombafort and Alphabol tablets were used for the analysis.

The optimal conditions for HPLC-DAD separation of two anabolic steroids were as follows: a core-shell Poroshell HPH-18 column (3.0 x 100 mm, particle size 2.7 μm), the mobile phase consisted of 40/60 (v/v) acetonitrile and deionized water under isocratic elution. Column temperature was 30 ° C, injection volume 1 μl and flow rate was set at 0.5 ml/min. The UV detection was performed at two wavelengths 225 nm for stanozolol and 245 nm for methandienone. The total time of analysis was 6 minutes.

The concentrations of stanozolol and methandienone were determined in the pharmaceutical products Alphabol and Strombafort. Pharmaceutical product Alphabol contained $100.31 \pm 0.18\%$ of the declared amount of methandienone and pharmaceutical product Strombafort contained $92.76 \pm 0.29\%$ of the declared amount of stanozolol. Based on the values above, it was verified that Alphabol contained only methadienone of the same amount as declared in the package leaflet. The Strombafort product contained stanozolol, but in a smaller amount than it was declared in the package leaflet. Besides it was established that pharmaceutical product Strombafort contained also a small amount of another unknown substance, that appeared on its' chromatogram.

Key words

Anabolic steroids, stanozolol, methandienone, HPLC-DAD

Poděkování

Chtěla bych podekovat RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady a čas, který mi obětoval, a především za trpělivost při vypracování mé bakalářské práce.

Ráda bych také podekovala celé své rodině za jejich podporu během celého mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Anabolické androgenní steroidy	10
2.2 Biosyntéza testosteronu	10
2.3 Struktura a vlastnosti stanozololu a methandienonu.....	11
2.4 AAS v lékařství a sportu	12
2.4.1 Vedlejší účinky AAS	13
2.5 Metody používané ke stanovení AAS	13
2.5.1 Metody využívané ke stanovení stanozololu a methandienonu.....	14
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
3.1 Chemikálie	17
3.2 Přístroje	18
3.2 Programy.....	18
3.4 Příprava standardů	18
3.5 Optimalizace podmínek separace stanozololu a methandienonu.....	19
3.6 Stanovení čistoty standardů stanozololu a methandienonu	19
3.7 Příprava placeba.....	20
3.8 Příprava kalibračních roztoků	20
3.9 Stanovení výtěžnosti	21
3.10 Příprava vzorků tablet Strombafortu a Alphabolu	22
3.11 Mez detekce a mez stanovitelnosti	22
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	23
4.1 Optimalizace podmínek separace stanozololu a methandienonu.....	23
4.2 Stanovení čistoty standardů stanozololu a methandienonu	26
4.3 Placebo.....	29
4.4 Kalibrační závislost.....	30
4.5 Mez detekce a mez kvantifikace	30
4.6 Výtěžnost	31
4.7 Stanovení anabolických steroidů v přípravcích Strombaford a Alphabol	31
5. ZÁVĚR.....	35
6. POUŽITÁ LITERATURA	36

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

°C	stupeň Celsiův, jednotka teploty
c	koncentrace
C18	oktadecylová stacionární fáze
C8	oktylová stacionární fáze
DAD	detektor diodového pole (z angl. diode-array detector)
DHT	Dihydrotestosteron
GBG	globulin vázající pohlavní steroidy (z angl. gonadal steroid-binding globulin)
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. human immunodeficiency virus)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
k_i	retenční faktor
LC	kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
LH	Luteinizační hormon
LLE	extrakce kapaliny kapalinou (z angl. liquid-liquid extraction)
LOD	mez detekce (z angl. limit of detection)
LOQ	mez kvantifikace (z angl. limit of quantification)
mAU	relativní jednotka prošlého světla (z angl. arbitrary unit)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
P	rozdělovací koeficient
RIA	radioimunoanalýza (z angl. radioimmunoassay)

RPM	počet otáček rotoru za minutu (z angl. revolutions per minute)
$R_{i,j}$	rozlišení dvou píků
SFC	superkritická fluidní chromatografie (z angl. supercritical fluid chromatography)
SHBG	globulin vázající pohlavní hormony (z angl. sex hormone-binding globulin)
SPE	extrakce tuhou fází (z angl. solid phase extraction)
t_M	mrtvý čas kolony
$t_{R,i}$	retenční čas analytu
UHPLC	ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (z angl. ultraperformance liquid chromatography)
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie (z angl. ultraviolet-visible spectrophotometry)
v/v	objemový poměr
$w_{i,j}$	šířka píku v polovině výšky
λ	vlnová délka

1. ÚVOD

Anabolické androgenní steroidy (AAS) jsou využívány po desetiletí v léčbě různých typů onemocnění. Ale pro své anabolické účinky AAS jsou široce využívány vrcholovými sportovci jak v profesionálním, tak i amatérském sportu, zejména v oblasti kulturistiky. Ačkoliv, prodej a užívání AAS bylo omezeno pouze pro terapeutické účely, v současné době jsou tyto látky běžně k dostání u dealerů, nebo prostřednictvím internetových obchodů. Takto získané prostředky jsou často padělky originálních léčiv. Některé z nich vůbec neobsahují žádný aktivní steroid nebo obsahují odlišné množství steroidů než je deklarováno na obalu. V některých případech dochází k záměně aktivní látky za levnější anabolické steroidy. Všechny tyto skutečnosti mají zásadní vliv na lidské zdraví.

Nejběžnější analytické metody využívané ke stanovení anabolických steroidů v lékových přípravcích či různého druhu biologických maticích jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), plynová chromatografie (GC) a kapalinová chromatografie (LC) spojené s hmotnostní (MS), tandemovou hmotnostní (MS/MS) a UV/VIS detekce.

Tato bakalářská práce je zaměřena na vývoj a validaci metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s detektorem diodového pole (HPLC-DAD) ke stanovení vybraných anabolických steroidů, stanozololu a methandienonu, v tabletové formě a ověření, jestli dražší stanozolol není nahrazován levnějším methandienonem. K analýze byly použity tablety Strombafort a Alphabol.

2. TEORETICKÁ ČÁST

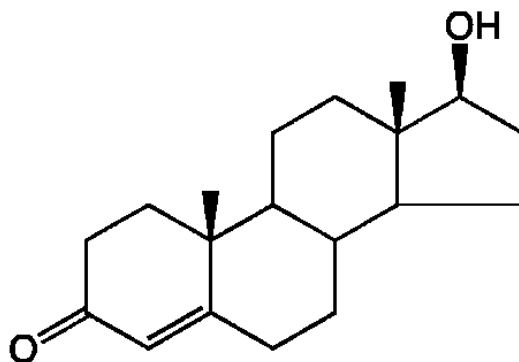
2.1 Anabolické androgenní steroidy

Anabolické androgenní steroidy (dále AAS) jsou definovány jako skupina syntetických derivátů mužského pohlavního hormonu testosteronu. AAS mají vliv na vývoj a funkce mužských pohlavních orgánů, projev mužských sekundárních pohlavních znaků (hlas, ochlupení atd.), – androgenní účinek, a zároveň ovlivňují růst kosterní tkáně, a především narůst svalové hmoty – anabolický účinek [1,2].

2.2 Biosyntéza testosteronu

Testosteron byl poprvé izolován a popsán L. Růžickou a A. Butenandtem v roce 1935. Za objev testosteronu dostali Nobelovou cenu za chemii v roce 1939 [3].

Testosteron je nejdůležitější mužský pohlavní hormon, který má ve své struktuře 19 atomů uhlíku. Na obr. 1.1. je znázorněna struktura testosteronu [13].



Obr. 1.1: Strukturní vzorec testosteronu

Testosteron vzniká u mužů hlavně v Leydigových buňkách varlete z cholesterolu a tvoří se též z androstendionu, uvolňovaného kůrou nadledvin [8,9]. Většina testosteronu v krvi je vázaná na bílkoviny, buď globulin vázající pohlavní hormony (gonadal steroid-binding globulin, GBG) nebo globulin vázající pohlavní steroidy (sex hormone – binding globulin, SHBG) a část je vázaná na albumin.

Prvním krokem biosyntézy testosteronu je vznik pregnenolonu. Tvoří se z cholesterolu hydroxylací C-22, C-20 uhlíků a oxidativním štěpením postranního řetězce. Reakce je katalyzovaná monooxygenázami z rodiny cytochromu P450. Pregnenolon se pak převede na dehydroepiandrosteron přes meziprodukt 17 α -hydroxypregnenolon hydroxylací v pozici 17 a následným odštěpením postranního řetězce. Na konci dehydroepiandrosteron

a androstendion jsou přeměňovány na testosteron. Produkce testosteronu je řízena luteotropním hormonem (LH) produkovaným gonadotropními buňkami adenohypofýzy [10,11].

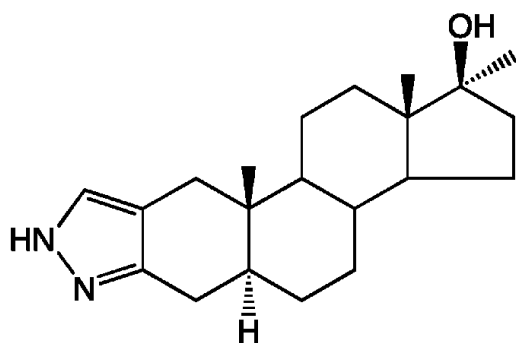
Testosteron je dále metabolizován dvěma enzymy: 5α -reduktázou a aromatázou. 5α -reduktáza redukuje dvojnou vazbu a přeměňuje testosteron na dihydrotestosteron (DHT). Působením aromatázy v molekule vzniká aromatický kruh, což vede ke vzniku estradiolu [12]. DHT a estradiol se vyskytují buď volné nebo vázané na GBG, SHBG a albuminy [8].

2.3 Struktura a vlastnosti stanozololu a methandienonu

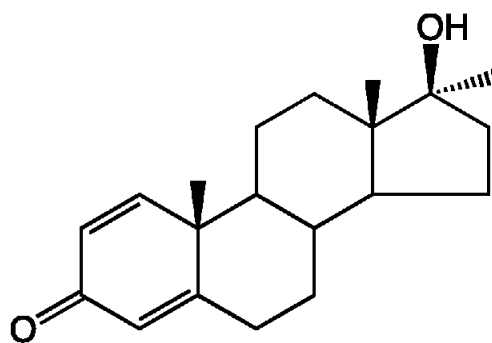
Strukturní modifikací molekuly testosteronu lze ovlivnit androgenní a anabolické vlastnosti jednotlivých steroidů. Tato bakalářská práce je zaměřena na 2 deriváty testosteronu: stanozolol [19] (obr. 1.2) a methandienon [20] (obr. 1.3).

Stanozolol a methandienon byly poprvé syntetizovány na konci 50. let. 20. století [14]. Jedná se o 17α -alkylované steroidy. Alkylace 17α -uhlíku zvyšuje odolnost molekuly vůči efektu prvního průchodu („first-pass“ efekt) játry, což umožňuje příjem zmíněných steroidů orální cestou. Modifikace na 17α uhlíku steroidního kruhu zvyšuje jaterní toxicitu, a proto se stanozolol a methandienon řadí k velmi hepatotoxickým látkám. Stanozolol je k dostání nejen v orální, ale také injekční formě. Zatímco methandienon je dostupný pouze v orální formě [15,16].

Stanozolol obsahuje pyrazolový kruh vázaný přes C-3 ketoskupinu, což zvyšuje anabolický účinek a částečně omezuje androgenní aktivitu látky [18]. Stanozolol patří do skupiny steroidů s účinkem podobným dihydrotestosteronu [15], které nejsou přeměňovány aromatasou [12]. Methandienon svými vlastnostmi je podobný testosteronu, snadno podléhá aromatizaci a přeměně na estrogen, což vede k nadměrnému zadržování vody v buňkách a tím způsobuje rychlý nárůst svalové hmoty [16]. Nahromadění estrogenů vede ke vzniku gynekomastie [17]. Základní fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných analytů jsou uvedeny v tab. 1.1.



Obr. 1.2: Strukturní vzorec stanozololu.



Obr. 1.3: Strukturní vzorec methandienonu.

Tab. 1.1: Základní fyzikálně-chemické vlastnosti stanozololu a methandienonu.

Látka	Molekulový vzorec	Relativní molekulová hmotnost	log <i>P</i>	Teplota tání [°C]
Stanozolol [21]	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	328,498	4,4	229,8 - 242,0
Methandienon [22]	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300,441	3,51	163,0 - 164,0

2.4 AAS v lékařství a sportu

AAS se používali a používají v léčbě různého druhu onemocnění. Hlavně byly používané při poruchách sexuální činnosti mužů, při hypofunkce gonád (hypogonadismus) [4]. Kromě toho AAS se také osvědčili při léčení anémie, lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), velkých popáleninách, jaterních a ledvinových selháních, plicních obtížích i při rakovině [1]. Byly také popsány případy používání anabolických steroidů pro zlepšení psychického stavu pacientů, kteří trpí depresemi [3].

Pro své anabolické účinky AAS byly široce využívány vrcholovými sportovci v řadě sportovních odvětví pro zvýšení svojí fyzické síly a nárůstu objemu svalové hmoty. Od roku 1967 bylo zakázáno používání AAS na Olympijských hrách [1]. Nicméně anabolické steroidy dodnes hrají významnou roli jak v profesionálním, tak i v amatérském sportu, zejména v kulturistice a silových sportech [5]. Přesto, že prodej a užívání AAS bylo omezeno pouze pro terapeutické účely, v současné době existuje velké množství webových stránek, které nabízí internetový prodej AAS bez lékařského předpisu. Výrobky prodávané na takových stránkách jsou často padělky originálních léčiv. Některé z nich vůbec neobsahují žádný aktivní steroid, v jiných je množství

steroidu vyšší, popřípadě nižší, než deklarováno na obalu. V některých případech dochází k záměně aktivních steroidů za jiné, většinou levnější steroidy. Všechny tyto skutečnosti mají zásadní vliv na lidské zdraví.

2.4.1 Vedlejší účinky AAS

Vedlejší účinky AAS na lidský organismus můžeme rozdělit na reverzibilní a ireverzibilní [6]. K nejběžnějším reverzibilním vedlejším účinkům patří akné, změny nálady, únava, problémy se spánkem, pokles spermatogenese až impotence. Mezi nejzávažnější nevratné účinky řadíme gynekomastii, poškození jater a ledvin, zvýšení hladiny cholesterolu, což může vest k infarktu a následně smrti. U žen zneužívání AAS vede ke hrubnutí hlasu a nadprůměrnému růstu chlupů, v horším případě k poruchám menstruačního cyklu, které mohou vyústit v neplodnost [7]. Několik studií zabývajících se vlivem AAS na lidskou psychiku popsali silné projevy agresivity, úzkosti a podrážděnosti jedinců [1].

2.5 Metody používané ke stanovení AAS

Anabolické steroidy lze stanovit řadou různých analytických metod. První metodou používanou ke stanovení AAS byla radioimunoanalýza (RIA) [1]. Ale z důvodů její malé selektivity byla nahrazena plynovou chromatografií (GC), která je často spojená s hmotnostní (MS) nebo tandemovou hmotnostní detekcí (MS/MS). Plynová chromatografie je citlivá a účinná metoda, která se používá ve většině forenzních a dopingových laboratořích. Analýza AAS pomocí GC vyžaduje časově náročnou derivatizaci analytů ke zvýšení jejich těkavosti. Další běžně používanou technikou ke stanovení AAS je kapalinová chromatografie (LC) s tandemovou hmotnostní detekcí nebo UV detekcí. Během posledních let došlo k rozvoji superkritické fluidní chromatografie (SFC), která spolu s ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC) spojenou s MS/MS se stala standardní technikou používanou k provedení antidopingových testů [23].

AAS jsou stanovované v biologických matricích jako je moč, krevní sérum či plasma a srst zvířat [24], [26-29], [31], ale také i ve farmaceutických přípravcích – tabletách nebo injekcích [25], [30]. Při práci s matricemi je nutné nejdříve analyt z ní izolovat. Nejčastěji využívanou technikou zpracování vzorků je extrakce kapaliny kapalinou (LLE) a extrakce tuhou fází (SPE) [24], [26-29], [31].

2.5.1 Metody využívané ke stanovení stanozololu a methandienonu

Běžnou analytickou metodou ke stanovení těchto analytů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích za použitím oktadecylové (C18) nebo oktylové (C8) stacionární fáze. Jako mobilní fáze se běžně používá směs methanolu [24,26], popřípadě acetonitrilu s vodnou složkou jako je například acetátový pufr nebo kyselina mravenčí [25,27,28,30].

Práce z roku 2015 se zaměřila na vyvinutí nové metody stanovení anabolických steroidů pomocí UHPLC-MS/MS [30]. Bylo současně analyzováno 26 steroidů z různých padělaných léčivých přípravků a doplňků stravy. V rámci těchto 26 AAS byl i methandienon. Vzorky byly připraveny rozpouštěním analytu v 50 ml směsi methanolu a deionizované vody (70:30) a vloženy do ultrazvukové lázně pro lepší rozpuštění na 30 min. Následně roztoky byly přefiltrovány pomocí teflonových filtrů a změřené metodou UHPLC-MS/MS. Byla použita kolona ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2,1 mm × 100 mm; 1,7 μm) a jako mobilní fáze směs vodného roztoku 0,1 % kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Příklady stanovení methandienonu jak v lékových přípravcích, tak i v biologických maticích jsou přehledně uvedeny v tab. 1.3.

Jedna z prací zaměřených na stanovení anabolických steroidů v lékových přípravcích zabavených na černém trhu pochází z roku 2008 [25]. Mezi zabavené farmaceutické přípravky se objevily přípravky, obsahující stanozolol a methandienon. Před analýzou byly tablety homogenizovány a rozpouštěny v 10 ml methanolu pomocí ultrazvukové lázně. Vzorky byly následně vloženy do centrifugy a supernatant byl naředěn methanolem v poměru 1:9. Analýza byla provedená pomocí kapalinového chromatografu s kolonou Zorbax XDB C₈ (4,6 mm x 150 mm, 5 μm) a hmotnostním detektorem. Složením mobilní fáze byla směs 5 mM acetátu amonného s 0,1 % kyselinou octovou a acetonitrilu. Příklady stanovení stanozololu jak v lékových přípravcích, tak i v biologických maticích jsou přehledně uvedeny v tab. 1.2.

Tab. 1.2: Přehled stanovení stanozololu

Analyt	Typ vzorku	Stacionární fáze – kolona	Mobilní fáze (A/B)	Gradient (A/B)	Detekce	LOD	LOQ
Stanozolol a jiné steroidy [24]	Koní plasma	Ace C ₈ (2,1 mm × 50 mm, 5 μm)	CH ₃ OH/HCOONH ₄ 2 mmol/l, pH 3,4 (v/v)	(t:0-4-8-8,1-8,2-10,4- 10,5 min) A:60-60-90-60-60- 60-60 %	MS/MS	25 pg/ml	25 pg/ml
Stanozolol a jiné steroidy [25]	Injekční roztoky a tablety	Zorbax XDB C ₈ (4,6 mm × 150 mm, 5 μm)	5mM CH ₃ COONH ₄ – 0,1 % CH ₃ COOH/ CH ₃ CN (v/v)	(t: 0-8-13 min) A: 95-5-5 %	MS/MS	-	-
Stanozolol, jiné steroidy a jejich estery [26]	Koňská hříva	Acquity UPLC BEH C ₁₈ (2,1 mm × 100 mm, 1,7 μm)	5mM H ₃ CCOONH ₄ , pH 3,0/CH ₃ OH (v/v)	(t:0-0,5-17-20 min) A: 40-98-40-40 %	MS	0,3 pg/mg	-
Stanozolol a jeho metabolity [27]	Lidská moč	Waters Symmetry C ₁₈ (2,1 mm × 100 mm, 3,5 μm)	CH ₃ CN/ 0,1 % HCOOH (v/v)	(t:0–5-25-30-32 min) A:5-15-40-30-95 %	MS/MS	10 pg/ml	-
Stanozolol a jeho metabolit [28]	Moč dobytka	Kingsorb C ₁₈ (2 mm × 250 mm, 5 μm)	CH ₃ CN/H ₂ O – 40 mM CH ₃ COONH ₄ (60/40, v/v)	-	MS	-	1 ng/ml

Tab.1.3: Přehled stanovení methandienonu

Analyt	Typ vzorku	Stacionární fáze – kolona	Mobilní fáze (A/B)	Gradient (A/B)	Detekce	LOD	LOQ
Methandienon a jiné steroidy [24]	Koní plasma	Ace C ₈ (2,1 mm × 50 mm, 5 μm)	CH ₃ OH/HCOONH ₄ 2 mmol/l, pH 3,4 (v/v)	(t: 0-4-8-8,1-8,2- -10,4-10,5 min) A: 60-60-90-60-60- -60-60 %	MS/MS	25 pg/ml	25 pg/ml
Methandienon a jiné steroidy [25]	Tablety	Zorbax XDB C ₈ (4,6 mm x 150 mm, 5 μm)	5mM CH ₃ COONH ₄ - 0,1% CH ₃ COOH/CH ₃ CN	(t: 0-8-13 min) A: 95-5-5 %	MS/MS	-	-
Methandienon a jiné steroidy [29]	Koní moč	Supelcosil LC-8-DB (10 cm × 2.1 mm, 3 μm)	0,1% H ₃ COOH - H ₂ O/CH ₃ OH (v/v)	(t: 0 – 5-10-15 min) B: 40–100-40-40 %	MS/MS	-	-
Methandienon a jiné steroidy [30]	Tablety	Waters ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (2,1 mm × 100 mm, 1,7 μm)	0,1% HCOOH - H ₂ O/ CH ₃ CN (v/v)	(t: 0-3-17-20- -24,5 min) B: 20-20-100-20- -20 %	MS/MS	-	1,0 ng/ml
Methandienon a jeho metabolit [31]	Myší moč	Omnispher C ₁₈ (100 mm x 2 mm, 3 μm)	H ₂ O – 1 mM CH ₃ COONH ₄ /CH ₃ OH – 1 mM CH ₃ COONH ₄	(t: 0-1,5-15-18-19- -22 min) B: 25-25-95-95-25- -25 %	MS/MS	2,5 ng/ml	5 ng/ml

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- Acetonitril (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich, Německo)
- Methanol (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda získaná purifikací přístrojem Milli-Q (Millipore, Bedford, USA)
- Stanozolol (čistota 99,77 %, Marvel Pharma Inc., Čína)
- Methandienon (čistota 98,72 %, Sigma-Aldrich, Německo)
- Sodium strach glycolate (Zentiva)
- Magnesium stearate (Zentiva)
- Lactose Monohydrate 200 Mesh (Zentiva)
- Avicel® PH-102 (Zentiva)
- Macrogol 6000 (Zentiva)
- Crospovidone (Zentiva)

Byly analyzované farmaceutické přípravky Strombafort od firmy Balkan Pharmaceuticals, Moldavsko (obr. 3.1) a Alphabol od firmy Alpha Pharma, India (obr. 3.2). Obsah stanozolu (účinné látky) v jedné tabletě byl dle hodnoty v příbalovém letáku 10 mg. Tableta také obsahovala další pomocné látky jako magnesium stearát, monohydrát laktózy, povidon a crospovidon v neurčitém množství. Obsah methandienonu (účinné látky) v přípravku Alphabol v jedné tabletě činil 10 mg. Tableta také obsahovala další pomocné látky, které nebyly v příbalovém letáku definovány.



Obr. 3.1: Originální obal analyzovaného farmaceutického přípravku Strombafort.



Obr. 3.2: Originální obal analyzovaného farmaceutického přípravku Alphabol.

3.2 Přístroje

- kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1260 Infinity s detektorem diodového pole Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector VL (G1315D) (Agilent Technologies, USA)
- kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1290 Infinity s hmotnostním detektorem QqQ 6460-trojitý kvadrupól (Agilent Technologies, USA)
- kolona Poroshell HPH -18 (3,0 x 100 mm, velikost částic 2,7 μ l)
- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, Německo)
- ultrazvuk ULTRASONIC LC 30 H (Elma, Německo)
- centrifuga MPW-65R, MPW

3.2 Programy

- sbírání dat v programu Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition verze C.01.06 (Agilent Technologies, USA)
- zpracování dat v programu Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition verze C.01.06 (Agilent Technologies, USA), Microsoft Excel 2013 (Microsoft Co., USA), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Co., USA)

3.4 Příprava standardů

Byly připravené roztoky standardů stanozololu, methandienonu a jejich směsi o koncentraci 0,5 mg/ml. Do 10 ml odměrné banky byly naváženy příslušná množství standardů analytů a doplněny methanolem po rysku. Dále byly odměrné banky vloženy do ultrazvukové lázně na 10 minut a každý roztok byl přefiltrován.

3.5 Optimalizace podmínek separace stanazololu a methandienonu

Jako mobilní fáze byla použita směs deionizované vody s acetonitrilem. Byly testované podmínky isokratické a gradientové eluce za různého objemového poměru jednotlivých složek mobilní fáze. Byl sledován vliv organické složky na retenci příslušných analytů a jejich rozlišení. Všechna měření byla provedena v tripletech při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a teplotě kolony 30 °C. Objem nástřiku byl 1 µl.

Hodnoty retenčního faktoru a rozlišení byly vypočítané podle následujících vzorců:

$$k_i = (t_{R,i} - t_M)/t_M \quad (3.1)$$

kde k_i je retenční faktor, $t_{R,i}$ je retenční čas daného analytu, t_M je mrtvý čas kolony.

$$R_{i,j} = [1,18 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})]/(w_i + w_j) \quad (3.2)$$

kde $R_{i,j}$ rozlišení dvou píků, $t_{R,i}$ a $t_{R,j}$ jsou retenční časy analytů, w_i a w_j jsou šířky píků v polovině jejich výšky.

3.6 Stanovení čistoty standardů stanazololu a methandienonu

Byla stanovena čistota použitých standardů stanazololu a methandienonu za podmínek gradientové eluce. Mobilní fáze byla směs deionizované vody (A) a acetonitrilu (B). Každé měření bylo provedené dvakrát za sebou. Všechny analýzy byly provedeny při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a teplotě kolony 30 °C. Objem nástřiku byl 1 µl. Gradient, použitý pro stanovení čistoty standardů je uveden v tab.3.1.

Tab. 3.1: Gradient použitý pro stanovení čistoty standardů stanazololu a methandienonu. Složka A je deionizovaná voda, složka B je acetonitril.

Čas [min]	A (obj. %)	B (obj. %)
0	80	20
15	20	80
20	20	80
22	80	20
26	80	20

3.7 Příprava placeba¹

Každá tableta obsahuje určité množství excipientů². Jako placebo byla použita směs běžně používaných excipientů ve farmaceutickém průmyslu, jelikož informace o přesném složení excipientů analyzovaných léčivých přípravků nejsou známy. Seznam použitých excipientů pro přípravu placeba je uveden v tab. 3.2.

Bylo naváženo 50 mg každého excipientu do odměrné baňky a doplněno methanolem na výsledný objem 25 ml. Odměrná baňka s roztokem placeba byla vložena do ultrazvukové lázně na 10 min. Následně byl roztok centrifugován 10 min při 12500 RPM. Roztoky supernatantu byly přefiltrovány a změřeny optimalizovanou HPLC metodou s DAD detektorem.

Tab. 3.2: Seznam excipientů použitých pro přípravu placeba.

Excipienty použité pro přípravu placeba
sodium strach glycolate;
magnesium stearate;
lactose monohydrate 200 Mesh;
Avicel PH-102;
Macrogol 6000;
crospovidone.

3.8 Příprava kalibračních roztoků

Bylo připraveno 7 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí od 20 % do 140 % obsahu stanovovaných AAS v tabletách.

Nejdříve byl připraven základní roztok směsi stanozololu a methandienonu, tak aby výsledná koncentrace roztoku odpovídala hodnotě 0,56 mg/ml (140 % obsah AAS v tabletách). Do 25 ml odměrné baňky byla navážena příslušná množství standardů stanozololu a methandienonu. Odměrná baňka byla následně doplněna methanolem po rysku a vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně. Postupným ředěním bylo připraveno

¹ Roztok, neobsahující účinnou látku.

² Pomocná látka léčivého přípravku.

6 kalibračních roztoků směsi stanozololu a methandienonu o koncentracích 0,48 mg/ml, 0,40 mg/ml, 0,32 mg/ml, 0,24 mg/ml, 0,16 mg/ml a 0,08 mg/ml tak, že postupně bylo pipetováno příslušné množství základního roztoku a ředěno methanolem na výsledný objem 1 ml. Ředící řada použitá pro přípravu kalibračních roztoků o příslušných koncentracích je uvedena v tab. 3.3. Roztoky byly před umístěním do LC vialky přefiltrovány.

Tab. 3.3: Ředící řada použitá pro přípravu kalibračních roztoků o příslušných koncentracích.

Koncentrační hladina [%]	Koncentrace [mg/ml]	Objem roztoku směsi dvou analytů [μl]	Objem methanolu [μl]	Celkový výsledný objem [ml]
140	0,56	1000	0	1
120	0,48	857	143	1
100	0,40	714	286	1
80	0,32	571	429	1
60	0,24	429	571	1
40	0,16	286	714	1
20	0,08	143	857	1

3.9 Stanovení výtěžnosti

Do třech 25 ml odměrných baněk byla navážena množství standardů stanozololu a methandienonu odpovídající koncentraci 0,4 mg/ml (odpovídá obsahu tablety) a přidaná stejná množství excipientů, jako při přípravě roztoku placebo. Všechny odměrné baňky byly doplněné methanolem po rysku a vloženy na 10 min do ultrazvukové lázně. Roztok byl centrifugován po 10 min při 12500 RPM. Supernatant byl přefiltrován a změřen optimalizovanou HPLC metodou s DAD detektorem. Byla stanovena výtěžnost standardů stanozololu a methandienonu z placebo.

Výtěžnost byla vypočítána podle vzorce:

$$výtěžnost = \frac{c_{skutečná}}{c_{teoretická}} \cdot 100\% \quad (3.3)$$

3.10 Příprava vzorků tablet Strombafortu a Alphabolu

Z každého balení farmaceutických přípravků Strombafort a Alphabol byly použity dvě tablety. Nejprve tablety byly zváženy, dále rozetřeny v třecí misce pomocí tloučku, převedeny do 25 ml odměrné baňky a doplněny methanolem po rysku. Potom byly odměrné baňky vloženy na 10 min do ultrazvukové lázně. Roztok byl centrifugován po 10 min při 12500 RPM. Supernatant byl přefiltrován a změřen optimalizovanou HPLC metodou s DAD detektorem. Byl vypočten obsah AAS v tabletě.

3.11 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány podle následujících vztahů:

$$LOQ = (10 \cdot h_n)/m \quad (3.4)$$

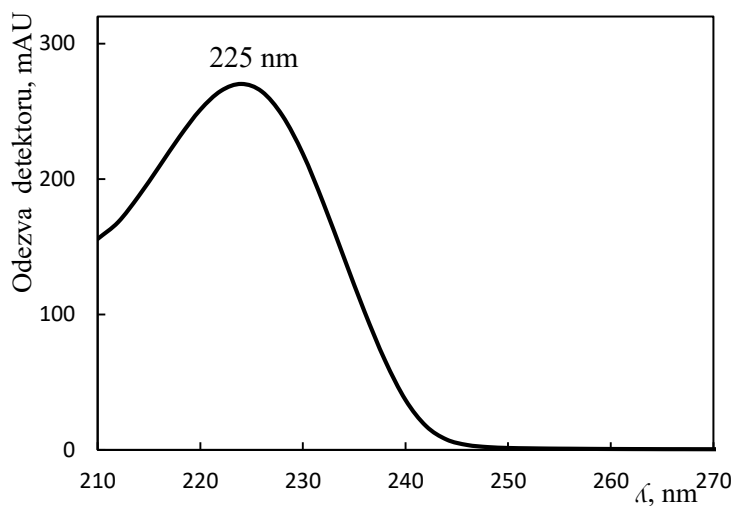
$$LOD = (3 \cdot h_n)/m \quad (3.5)$$

kde h_n je šum na základní linii a m je směrnice kalibrační křivky ze závislosti výšky píku na koncentraci analytů.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

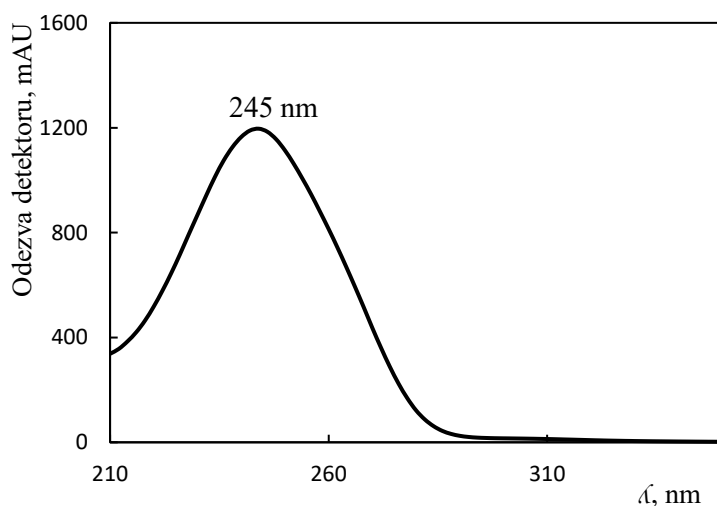
4.1 Optimalizace podmínek separace stanozololu a methandienonu

Vzorek stanozololu byl detekován při vlnové délce 225 nm, která odpovídala vlnové délce absorpčního maxima daného analytu. Absorpční spektrum stanozololu je uveden na obr. 4.1.



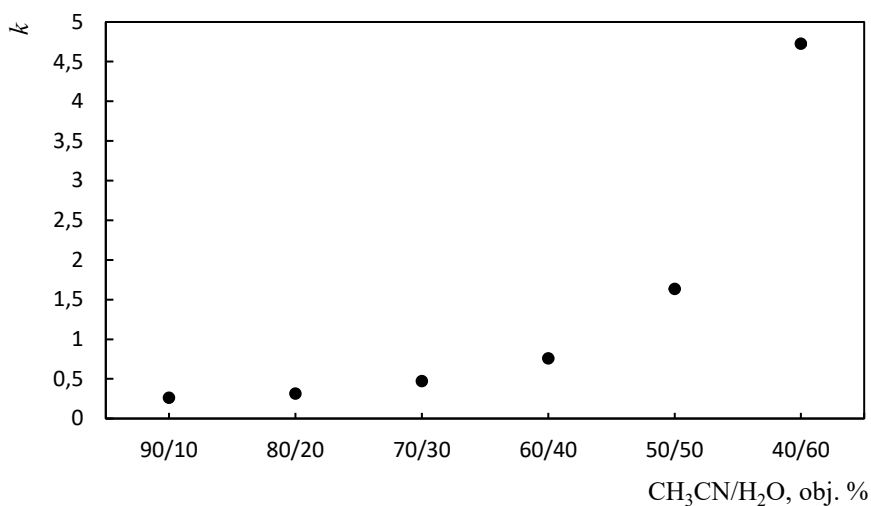
Obr. 4.1: Absorpční spektrum stanozololu v UV oblasti

Vzorku methandienonu byl detekován při vlnové délce 245 nm, která odpovídala vlnové délce absorpčního maxima daného analytu. Absorpční spektrum methandienonu je uveden na obr. 4.2.

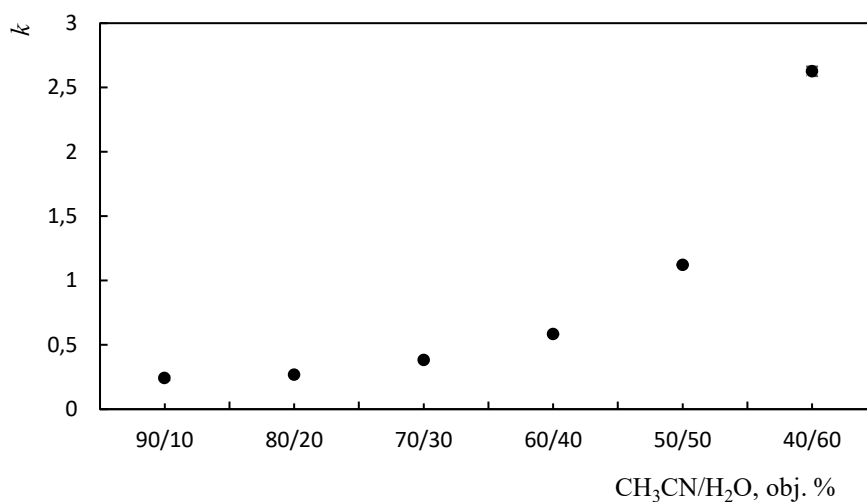


Obr. 4.2: Absorpční spektrum methandienonu v UV oblasti

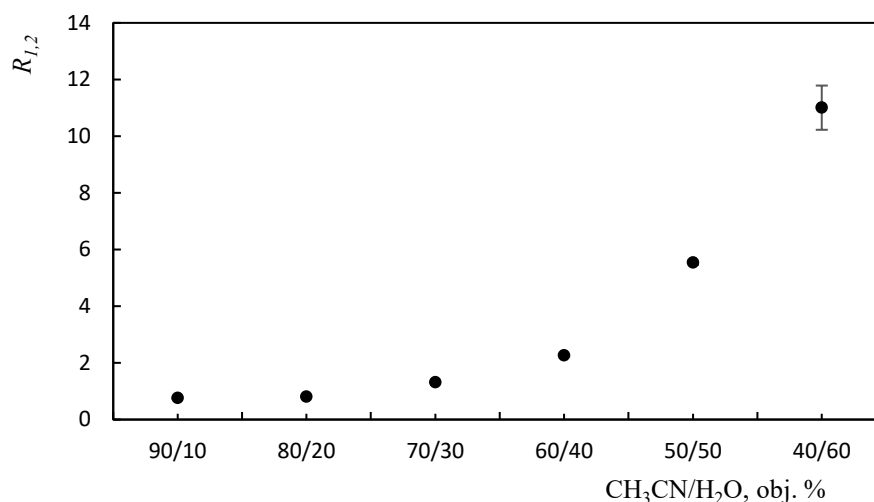
Byla testovaná mobilní fáze acetonitril-voda v různých objemových poměrech. Byl sledován vliv organické složky na retenční faktory příslušných analytů a jejich rozlišení. Všechna měření byla provedena třikrát a následně zprůměrována. Závislosti retenčních faktorů a rozlišení stanazololu a methandieninu na objemovém poměru organické složky v mobilní fáze acetonitril/voda jsou znázorněny na obr. 4.3, obr. 4.4 a obr. 4.5.



Obr. 4.3: Graf závislosti retenčního faktoru stanazololu na objemovém poměru organické složky v mobilní fáze acetonitril/voda. Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, teplotě kolony 30 °C, objem nástřiku 1 μ l.



Obr. 4.4: Graf závislosti retenčního faktoru methandienonu na objemovém poměru organické složky v mobilní fáze acetonitril/voda. Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 1 μ l.



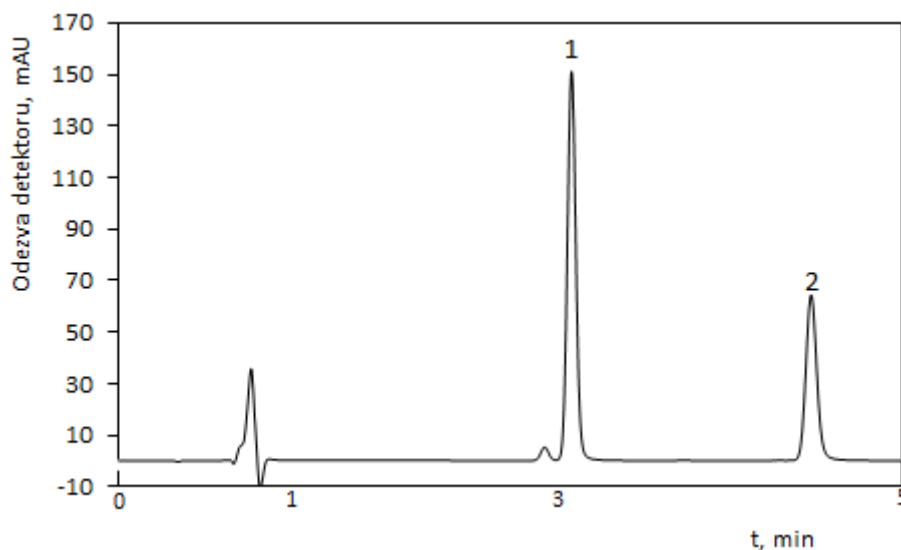
Obr. 4.5: Graf závislosti rozlišení píků stanazololu a methandienonu na objemovém poměru organické složky v mobilní fázi acetonitril/voda. Průtok 0,5 ml/min, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 1 μ l.

Mrtvý čas kolony byl určen ze systémového píku a jeho hodnota byla 0,842 min.

Z grafů obr. 4.3 a obr. 4.4 je vidět, že retenční faktory stanazololu a methandienonu rostou s klesajícím objemovým poměrem acetonitrilu v mobilní fázi. Nejnižších hodnot retenční faktory obou analytů nabývají při 90 obj. % acetonitrilu a postupně rostou se zvyšováním vodné složky v mobilní fázi. Z grafu obr.4.5 je vidět, že vyšší rozlišení bylo dosaženo při vyšším objemovém poměru vodné složky v mobilní fázi. Při 90 obj. %, 80 obj. % a 70 obj. % acetonitrilu v mobilní fázi se rozlišení prakticky neměnilo a docházelo ke koeluci píků obou analytů. Rozlišení se výrazně začalo zvyšovat od hodnoty 60 obj. % acetonitrilu v mobilní fázi a rostlo dál se současným snížením objemového poměru acetonitrilu v mobilní fázi.

Jako optimální podmínky pro separaci standardu stanazololu a methandienonu a následující měření farmaceutických přípravků Strombafort a Alphabol, byla vybrána mobilní fáze acetonitril – voda poměru 40/60 obj. % za isokratické eluce. Tento poměr byl zvolen vzhledem k nečistotě, která eluovala těsně před methandienonem. Použitím isokratické eluce se podařilo rozdělit oba analyty na základní linii, přičemž doba analýzy nepřekročila 5 minut.

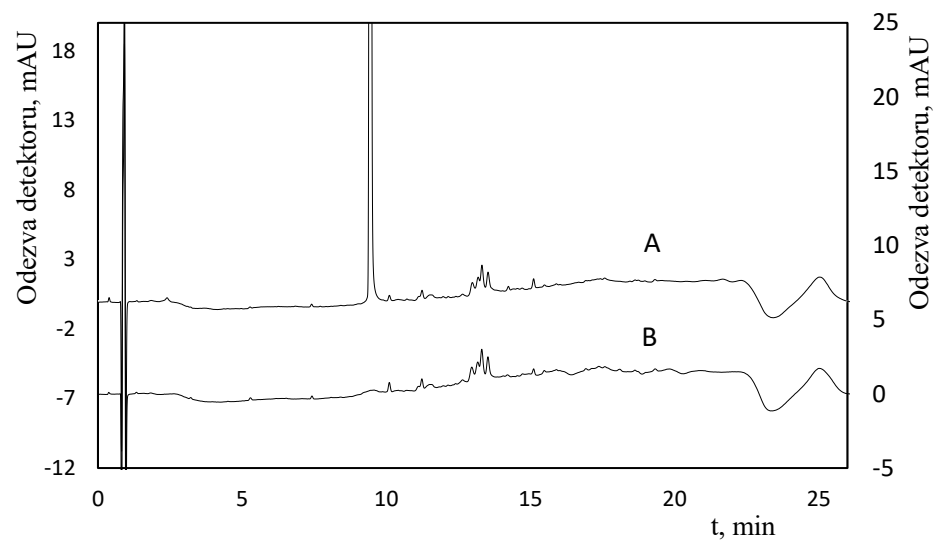
Chromatogram směsi standardů za optimalizovaných separačních podmínek je na obr. 4.6.



Obr. 4.6: Chromatogram směsi standardů za optimálních separačních podmínek: složení mobilní fáze acetonitril – voda 40/60 (v/v), isokratická eluce, průtok 0,5 ml/min, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 1 µl a UV detekce při 225 nm. Pořadí eluentů: 1 – methandienon, 2 – stanozolol.

4.2 Stanovení čistoty standardů stanozolu a methandienonu

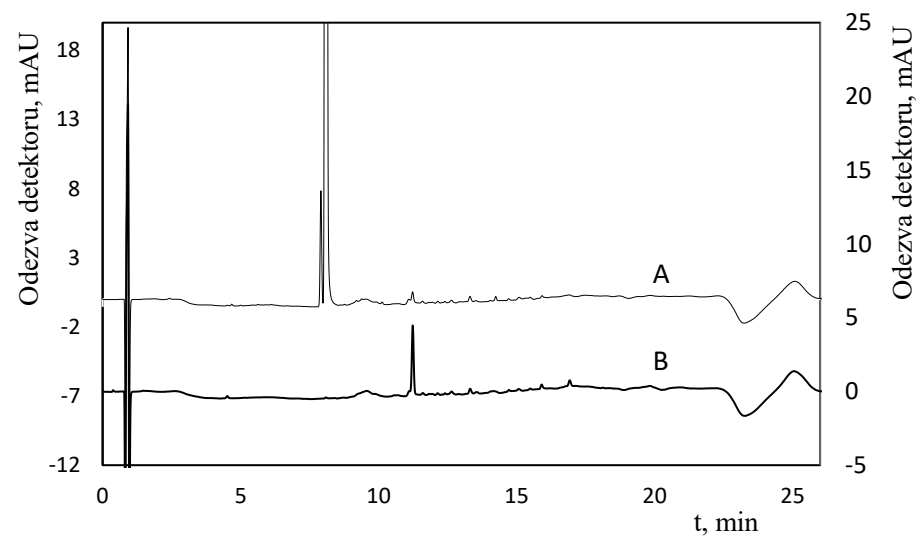
Čistota byla stanovena na základě relativní plochy vztažené k hlavní látce. V úvahu byly brány pouze nečistotou vyšší než 0,05 %. Výsledná čistota standardu stanozolu činila 99,77 %. Chromatogram čistoty standardu stanozolu je uveden na obr. 4.7. Výsledná čistota standardu methandienonu činila 98,72 %. Chromatogram čistoty standardu methandienonu je uveden na obr. 4.8. Gradient, použitý pro stanovení čistoty standardů je uveden v tab. 3.1.



Obr.4.7: A je chromatogram čistoty standardu stanozololu.

B je chromatogram methanolu.

Mobilní fáze: acetonitril/voda, gradientová eluce (tab. 3.1), průtok 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$,
teplota kolony 30 $^{\circ}\text{C}$, objem nástřiku 1 μl , vlnová délka 225 nm.



Obr.4.8: A je chromatogram čistoty standardu methandienonu.

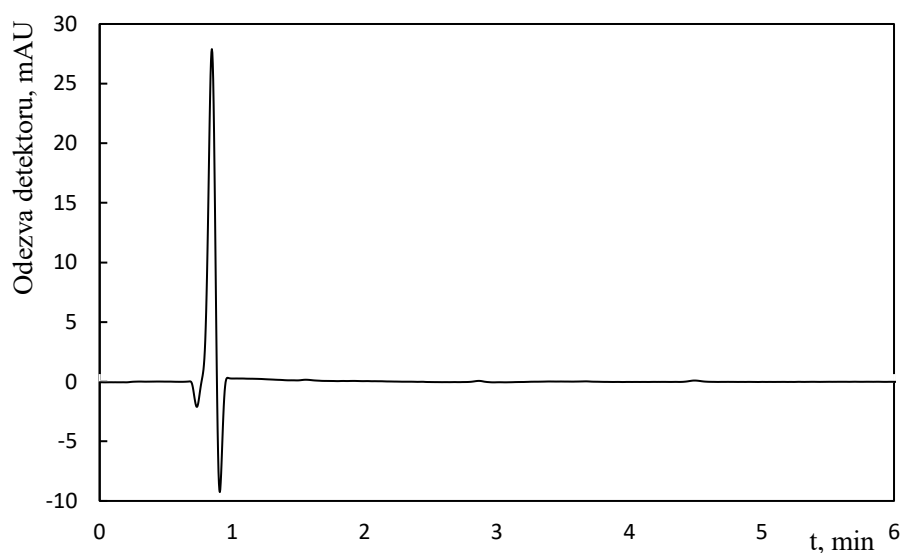
B je chromatogram methanolu.

Mobilní fáze: acetonitril/voda, gradientová eluce (tab. 3.1), průtok 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$,
teplota kolony 30 $^{\circ}\text{C}$, objem nástřiku 1 μl , vlnová délka 245 nm.

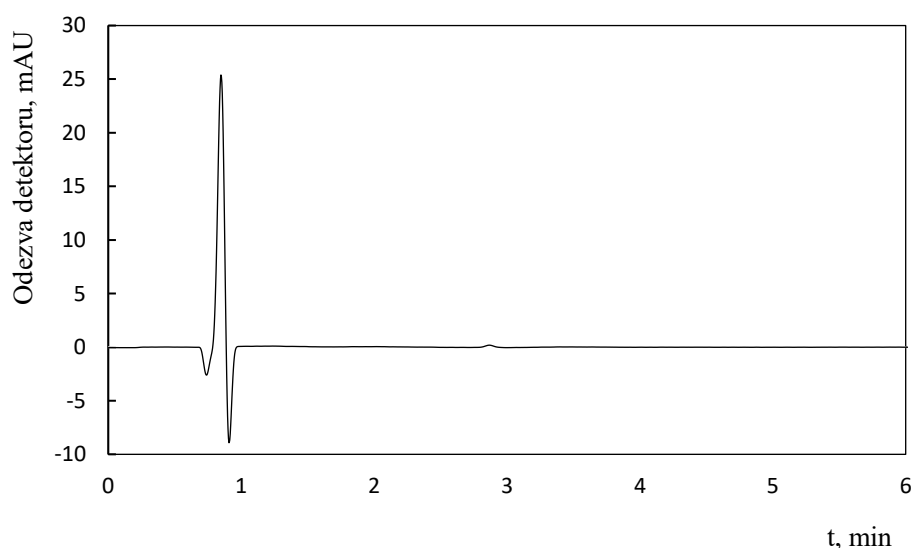
4.3 Placebo

Bylo ověřeno, že žádná složka placeba neinterferuje se stanozolem a methandienonem jak je zřejmé z obr. 4.9. a 4.10. Retenční čas stanozolu byl 4,8 min, retenční čas methandienonu byl 3 min.

Placebo bylo měřeno při dvou vlnových délkách, odpovídajících absorpčním maximům stanozolu 225 nm a methandienonu 245 nm.



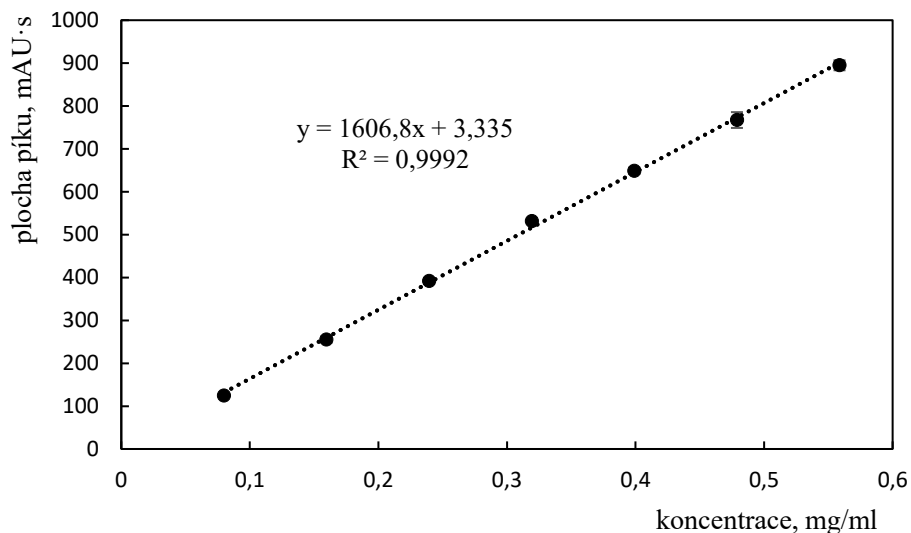
Obr. 4.9: Chromatogram placebo při 225 nm, odpovídajících absorpčnímu maximu stanozolu. Mobilní fáze: acetonitril/voda 40/60 obj. % (v/v), průtok 0,5 μ l/min, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 1 μ l.



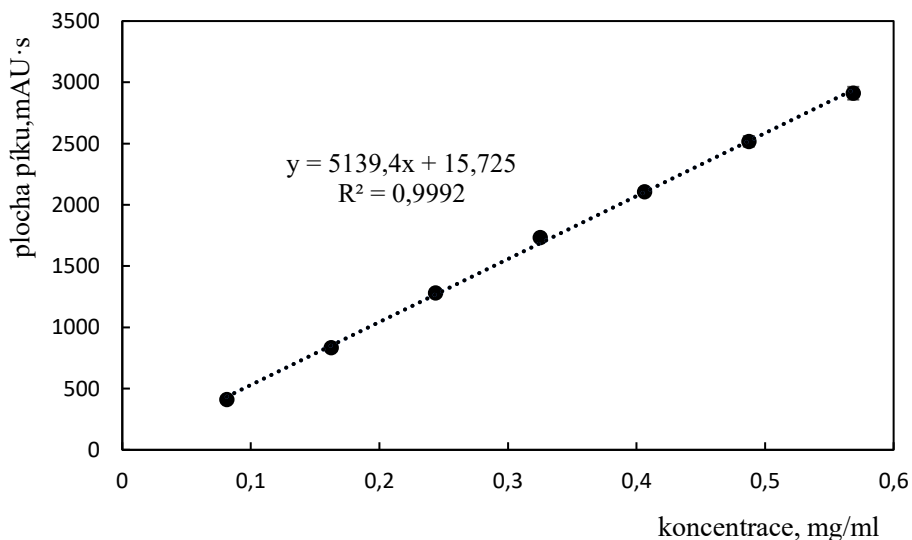
Obr. 4.10: Chromatogram placebo při 245 nm, odpovídajících absorpčnímu maximu methandienonu. Mobilní fáze: acetonitril/voda 40/60 obj. % (v/v), průtok 0,5 μ l/min, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 1 μ l.

4.4 Kalibrační závislost

Metodou lineární regrese byly vyhodnoceny závislosti ploch píků na koncentraci v programu Microsoft Excel 2016. Grafy lineárních regresí pro stanazolol a methandienon jsou uvedeny na Obr. 4.11. a Obr. 4.12.



Obr 4.11: Graf lineární regrese závislosti plochy píku stanazololu na jeho koncentraci.



Obr. 4.12: Graf lineární regrese závislosti plochy píku methandienonu na jeho koncentraci.

4.5 Mez detekce a mez kvantifikace

Šum základní linie stanazololu byl 0,05 mAU a u methandienonu byl 0,07 mAU. Ze závislosti výšky píků na koncentrace byly vypočítané kalibrační závislosti pro každý z analytů. Následně uvedené hodnoty byly dosažené do vzorců z kapitoly 3.11. Vypočítané hodnoty LOQ, LOD a směrnice kalibrační závislosti pro stanazolol a methandienon jsou uvedeny v tab. 4.1.

Tab.4.1: Vypočítané hodnoty LOQ, LOD a směrnice kalibrační závislosti pro stanozolol a methandienon.

Analyt	Směrnice kalibrační přímky [mg/ml · mAU]	LOD [μg/ml]	LOQ [μg/ml]
Stanozolol	226,25	0,663	2,21
Methandienon	1053,6	0,199	0,664

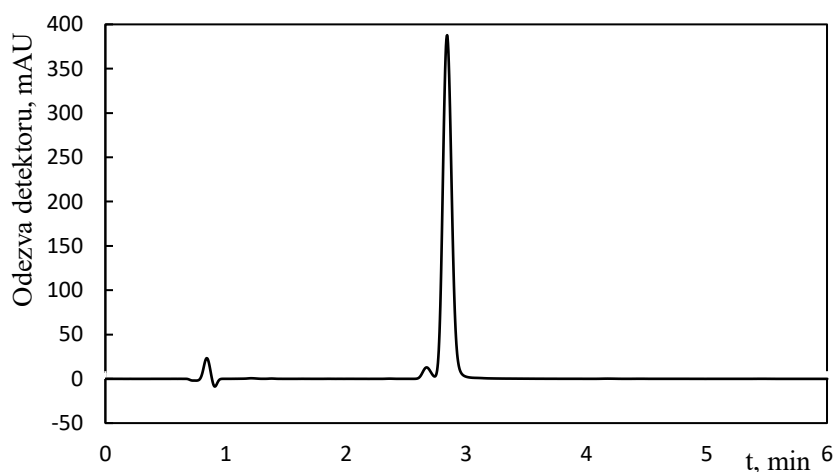
4.6 Výtěžnost

Byla vyjádřena hodnota skutečné koncentrace jednotlivých analytů v roztoku placebo z rovnic lineární regrese závislosti plochy píku na koncentraci uvedených v kapitole 4.4. Výtěžnost byla vypočítaná podle vzorce uvedeného v kapitole 3.9.

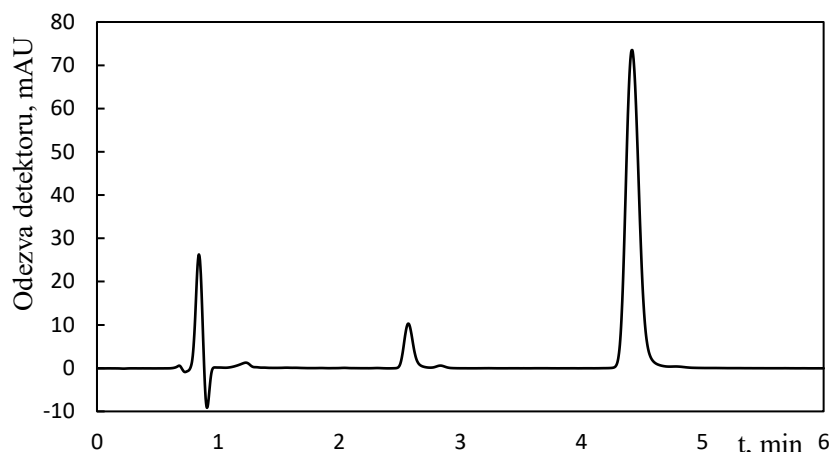
Výtěžnost pro standard stanozolu byla $96,38 \pm 3,21$ %. Výtěžnost pro standard methandienonu byla $98,93 \pm 3,17$ %.

4.7 Stanovení anabolických steroidů v přípravcích Strombafort a Alphabol

V analyzovaných přípravcích Strombafort a Alphabol byl stanoven obsah jednotlivých steroidů. Alphabol obsahoval $100,31 \pm 0,18$ % deklarovaného množství methandienonu a Strombafort obsahoval $92,76 \pm 0,29$ % deklarovaného množství stanozolu.



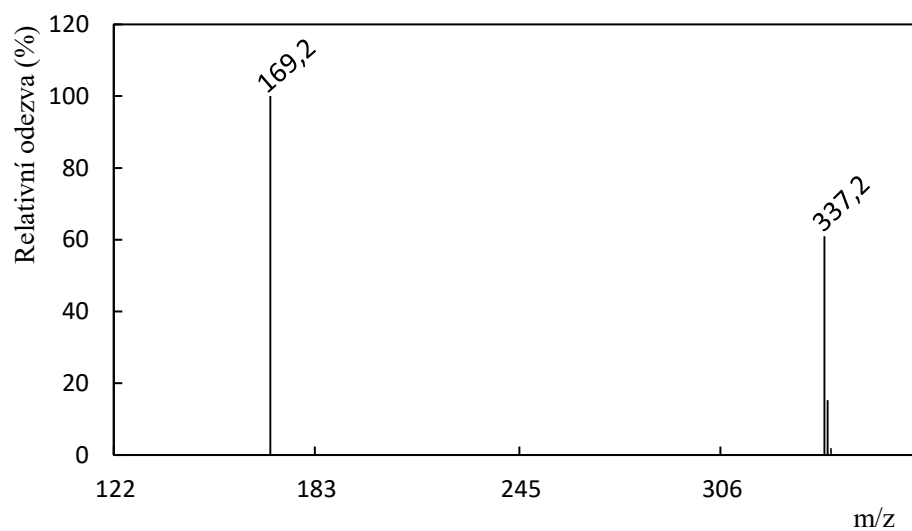
Obr. 4.13: Chromatogram farmaceutického přípravku Alphabol za optimalizovaných separačních podmínek: mobilní fáze acetonitril/voda 40/60 (v/v), průtok 1 μl/min, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 1 μl a vlnová délka 245 nm.



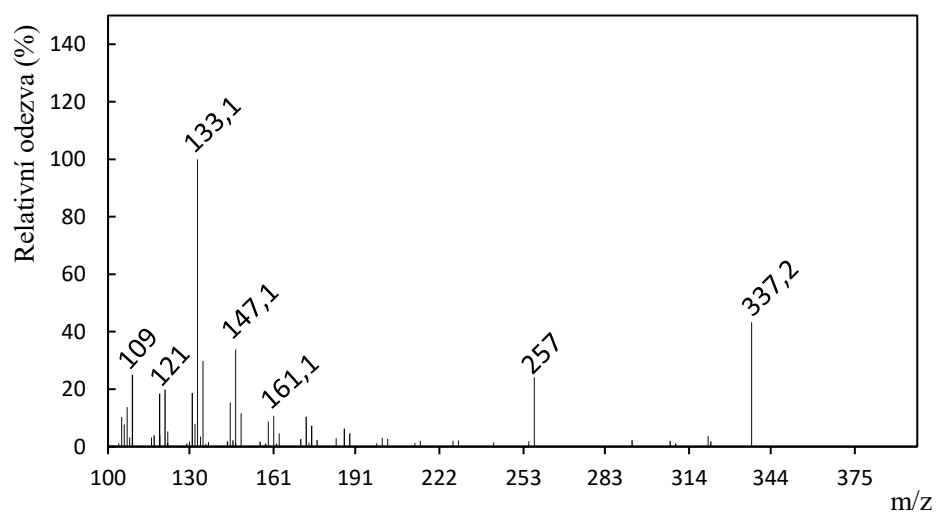
Obr. 4.14: Chromatogram farmaceutického přípravku Strombafort za optimalizovaných separačních podmínek: mobilní fáze acetonitril/voda 40/60 (v/v), průtok 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, teplota kolony 30 $^{\circ}\text{C}$, objem nástriku 1 μl a vlnová délka 225 nm.

Na základě uvedených hodnot lze dospět k závěru, že farmaceutický přípravek Alphabol obsahoval pouze methandienon o množství stejném, jak bylo deklarováno v příbalovém letáku. Farmaceutický přípravek Strombafort obsahoval stanozolol, ale v menším množství, než bylo uvedeno v příbalovém letáku, a také malé množství další neznámé látky. Z chromatogramu farmaceutického přípravku Strombafort (obr. 4.14) lze vidět, že pík dané neznámé látky má retenční čas 2,4 min.

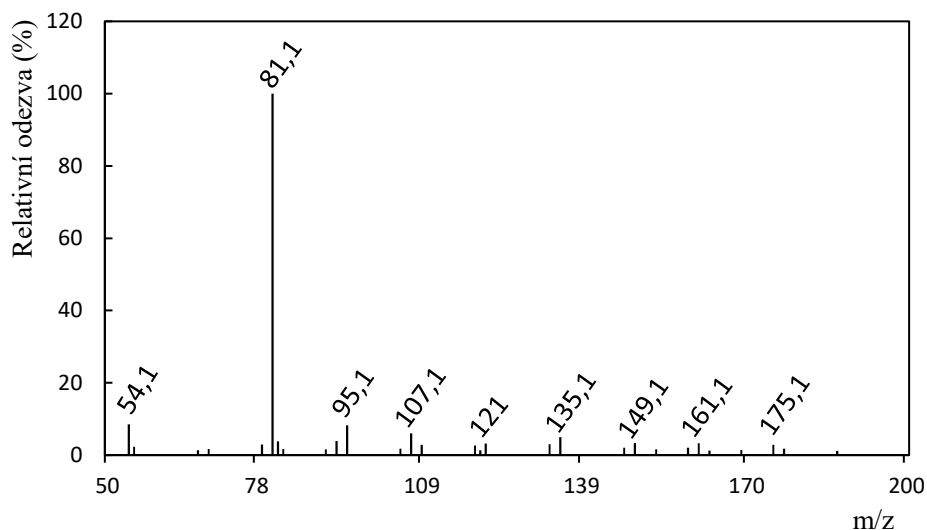
Pro identifikace neznámého píku byla použita optimalizována HPLC metoda s hmotnostní detekcí (MS) s trojitým kvadrupólem. Na obr. 4.15 je uvedeno hmotnostní spektrum píku s retencí 2,4 min měřené v pozitivním scan modu. Je vidět, že daný pík obsahuje dvě hmoty o m/z 337,2 a m/z 169,2. Tyto m/z byly následně fragmentovány v kolizní cele při energii 25 V. Hmotnostní spektrum získané fragmentací m/z 337,2 je uvedeno na obr. 4.16 a hmotnostní spektrum získané fragmentací m/z 169,2 na obr. 4.17.



Obr. 4.15: Hmotnostní spektrum neznámého píku s retencí 2,4 min.

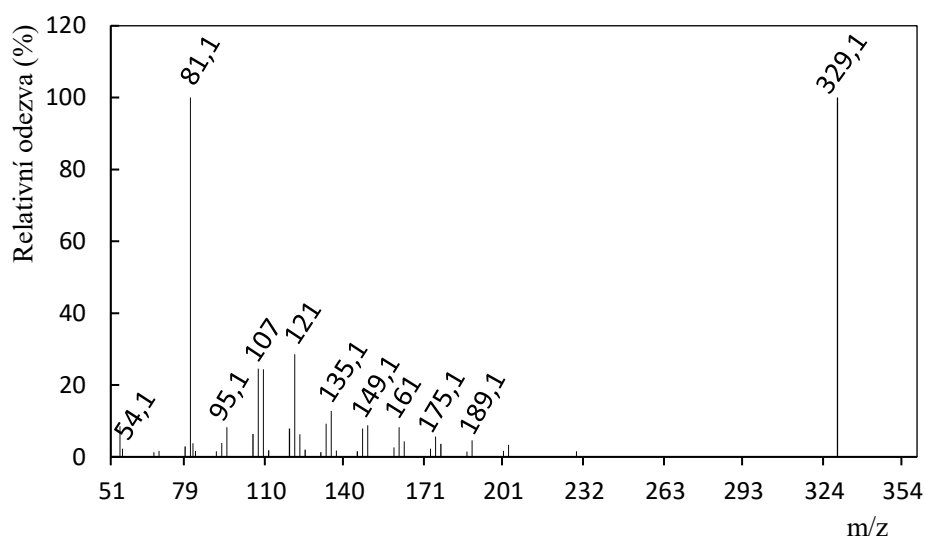


Obr. 4.16: Hmotnostní spektrum vzniklé fragmentací iontu m/z 337,2.



Obr. 4.17: Hmotnostní spektrum vzniklé fragmentací iontu o m/z 169,2.

Na obr. 4.18 je uvedeno hmotnostní spektrum vzniklé fragmentací m/z 329,1 standardu stanazololu změřeného za stejných podmínek jako neznámý pík.



Obr. 4. 18: Hmotnostní spektrum vzniklé fragmentací iontu o m/z 329,1.

Hmotnostní spektrum vzniklé fragmentací m/z 169,2 (obr. 4.17) obsahuje shodné fragmenty jako fragmentační spektrum vzniklé štěpením prekursoru m/z 329,1 odpovídajícímu iontu $[M+H]^+$ stanazololu (obr 4.18). Z toho usuzujeme, že chromatografický pík eluující v retenčním čase 2,4 min odpovídá pravděpodobně nějakému degradačnímu produktu stanazololu. Konkrétní strukturu se nám zatím nepodařilo určit.

5. ZÁVĚR

Byla vyvinuta rychlá a jednoduchá analytická metoda používající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s detekcí diodového pole ke stanovení vybraných anabolických steroidů, stanozololu a methandienonu, v tabletové formě, obsazených ve farmaceutických přípravcích Strombafort (Balkan Pharmaceuticals, Moldavsko) a Alphabol (Alpha Pharma, India). Optimální separační podmínky byly následující: složení mobilní fáze acetonitril/voda 40/60 obj. % (v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, teplota kolony 30 °C, objem nástriku 1 µl. Separace probíhala na koloně Poroshell HPH-18 (3,0 x 100 mm, velikost částic 2,7 µl), doba separace nepřesahovala 5 minut. Pro UV detekci methandienonu byla zvolena vlnová délka 245 nm, pro stanozolol - 225 nm.

Následně byla provedena validace HPLC-DAD metody. Byly určeny výtěžnosti pro oba studované analyty z tabletové formy. Výtěžnost pro stanozolol byla $96,38 \pm 3,21$ %. Výtěžnost pro methandienon byla $98,93 \pm 3,17$ %. LOD pro stanozolol byla stanovena na 0,663 µg/ml a 0,199 µg/ml pro methandienon. LOQ pro stanozolol byla stanovena na 2,21 µg/ml a 0,664 µg/ml pro methandienon.

V analyzovaných farmaceutických přípravcích byly stanoveny hodnoty koncentrace stanozololu a methandienonu. Farmaceutický přípravek Alphabol obsahoval $100,31 \pm 0,18$ % deklarovaného množství methandienonu a farmaceutický přípravek Strombafort obsahoval $92,76 \pm 0,29$ % deklarovaného množství stanozololu.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Fojtíková, L.; Goselová S.; Holubová B.: Anabolické androgenní steroidy – nebezpečí v doplncích stravy. *Chemické listy* **109**, 913–917 (2015).
- [2] Barceloux, D.G; Palmer, R.B.: Anabolic - Androgenic Steroids. *Disease-a-Month* **59**, 226 -248 (2013).
- [3] Kanayma, G.; Pope, H. G.: History and epidemiology of anabolic androgens in athletes and non-athletes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **464**, 4-13 (2018).
- [4] Rahnema, C. D.; Lipshultz, I. L.; Crosnoe, L. E.; Kovac, J. R.; Kim, E. D.: Anabolic steroid-induced hypogonadism: diagnosis and treatment. *Fertility and Sterility* **101**: 5, 1271-1279 (2014).
- [5] Šimurka, P.; Zavřel, M.: Anabolické steroidy a mládež. *Pediatric pro praxi* **9**:5, 294-297 (2008).
- [6] Steroid Effects | Short Term, Long Term & Side Effects. Dostupné z URL: <<http://drugabuse.com/library/the-effects-of-steroid-use/>> [cit.1.04.2018].
- [7] Lenehan, P.: *Anabolic steroids and other performance-enhancing drugs*. London; New York, Taylor and Francis 2003.
- [8] Koolman, J.; Röhme K-H.: *Barevný atlas biochemie*. Praha, Grada 2012.
- [9] Silbernagl, S.; Despopoulos, A.; Gay R.; Rothenburgen A.: *Atlas fyziologie člověka*. Praha, Grada 2004.
- [10] Testosterone: Meaning, Source and Synthesis (With Diagram). Dostupné z URL: <<http://www.biologydiscussion.com/hormones/biosynthesis-of-hormones/testosterone-meaning-source-and-synthesis-with-diagram/18600/>> [cit. 1.04.2018].
- [11] Ganong, W. F.: *Přehled lékařské fyziologie*. Praha, Galén 2002.
- [12] Anabolické steroidy 2 – mechanismus působení a metabolismus. Dostupné z URL: <<https://www.prirodovedci.cz/chemik/clanky/anabolicke-steroidy-2-mechanismus-pusobeni-a-metabolismus/>> [cit. 1.04.2018]
- [13] CAS 58-22-0, 4-ANDROSTEN-17 β -OL-3-ONE. Dostupné z URL: <<https://steraloids.com/4-androsten-17-ol-3-one-234/>> [cit. 1.04.2018]
- [14] Hanč, O.; Pádr, Z.: *Hormony: úvod do jejich chemie a biologie*. 2. vyd. Praha, Academia 1982.
- [15] Stanozolol. Dostupné z URL: <<https://www.steroid.com/Stanozolol/>> [cit. 1.04.2018].
- [16] METHANDIENONE - nejčastěji zneužívaný anabolicko - androgenní steroid. Dostupné z URL: <<http://www.fit-centrum.cz/odborne-clanky/3930-methandienone-nejcasteji-zneuživany-anabolicko-androgenni-steroid/>> [cit. 1.04.2018]
- [17] Kategorie: Tabletkový methandienone. Dostupné z URL: <<http://www.steroidy->

steroids.com/2-tabletkovy-methandienone/> [cit. 1.04.2018]

- [18] 17 TĚŽKÉ stanolových steroidní injekce Nežádoucí účinky & Nebezpečí. Dostupné z URL: <<https://steroidly.com/cs/stanol-steroid/>> [cit. 1.04.2018]
- [19] CAS 10418-03-8, 5 α -ANDROSTAN-17 α METHYL-17 β OL-[3, 2-c]PYRAZOLE. Dostupné z URL: <<https://steraloids.com/5-androstan-17-methyl-17-ol-3-2-c-pyrazole/>> [cit. 1.04.2018].
- [20] CAS 72-60-9, 1, 4-ANDROSTADIEN-17 α -METHYL-17 β -OL-3-ONE. Dostupné z URL: <<https://steraloids.com/1-4-androstadien-17-methyl-17-ol-3-one-651/>> [cit. 1.04.2018].
- [21] Stanozolol. Dostupné z URL: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25249>> [cit. 1.04.2018].
- [22] Methandrostenolone. Dostupné z URL: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6300>> [cit. 1.04.2018].
- [23] Desfontainea, V.; Nováková, L.; Ponzettoc, F.; Nicoli, R.; Saugyc, M.; Veuthey, J.-L.; Guillemea, D.: Liquid chromatography and supercritical fluid chromatography as alternative techniques to gas chromatography for the rapid screening of anabolic agents in urine. *Journal of Chromatography A* **1451**, 145 - 155 (2016). Dostupné z:doi:10.1016/j.chroma.2016.05.004.
- [24] Guan, F.; Uboh, C. E.; Lawrence, R. S.; Luo, Y.; Rudy, J.; Tobin, T.: Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **829**, 56–68 (2005). Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2005.09.045
- [25] Thevis, M.; Schrader, Y.; Thomas, A.; Sigmund, G.; Geyer, H.; Schanzer, W.: Analysis of Confiscated Black-Market Drugs Using Chromatographic and Mass Spectrometric Approaches. *Journal of Analytical Toxicology* **32**, 232–240 (2008). Dostupné z URL: doi:10.1093/jat/32.3.232
- [26] Kwok, K. Y.; Choi, T.L.S.; Kwok, W. H.; Wong, J.K.Y.; Wan, T.S.M.: Detection of anabolic and androgenic steroids and/or their esters in horse hair using ultra-high performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1493**, 76-86 (2017). Dostupné z:doi:10.1016/j.chroma.2017.03.007.
- [27] Wanga, Z.; Zhoub, X.; Liub, X.; Dong, Y.; Zhanga, J.: A novel HPLC-MRM strategy to discover unknown and long-term metabolites of stanozolol for expanding analytical possibilities in doping-control. *Journal of Chromatography B* **1040**, 250–259 (2017). Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2016.11.006.
- [28] Draisci, R.; Palleschi, L.; Marchiafava, C.; Ferretti, E.; Quadri, D. F.: Confirmatory analysis of residues of stanozolol and its major metabolite in bovine urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **926**, 69-77 (2001).

- [29] Yu, N. H.; Ho, N.M.E.; Leung, K.K.D.; Wan, S.M.T.: Screening of anabolic steroids in horse urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **37**, 1031–1038 (2005). Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2004.08.041
- [30] Cho, S-H.; Park, H- J.; Lee, J. H.; Do J-A.; Heo, S.; Jo, J. H.; Cho, S.: Determination of anabolic–androgenic steroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **111**, 138–146 (2015). Dostupné z:doi: 10.1016/j.jpba.2015.03.018
- [31] Lootens, L.; Meuleman, P.; Pozo, O.J.; Eenoo, Van P.; Leroux-Roels, G.; Delbeke, T. F.: uPA^{+/+}-SCID mouse with humanized liver as a model for *in vivo* metabolism of exogenous steroids: Methandienone as a case study. *Clinical Chemistry* **55**, 1783-1793 (2009). Dostupné z:doi: 10.1373/clinchem.2008.119396
- [32] Nováková, L.; Douša, M. a kol.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha, Europrint a.s. 2013.
- [33] HPLC – High Performance Liquid Chromatography Beginner’s Guide: Waters. Dostupné z URL: <http://www.waters.com/waters/en_CZ/HPLC---High_Performance-LiquidChromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10048919> [cit. 4.4.2018]